Aus dem Hygienischen Institut der Universität Bonn.
Direktor: Prof. Dr. Selter.

Verhalten der 3 Diphtheriebacillentypen Gravis, Mitis und Intermedius gegenüber erhöhten Temperaturen und bei Einwirkung chemischer und biologischer Stoffe.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität zu Bonn

Vorgelegt am 27. Oktober 1937
von

Arthur Leinbrock
aus Dresden.

*

BONN 1937
Buchdruckerei Kubens Nachf., Inh.: H. Schnitzler, Maxstr. 75

Gedruckt mit Genehmigung
der med. Fakultät der Universität Bonn
Referent: Prof. Dr. Selter
Korreferent: Prof. Dr. Martini

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Als Loeffler den Diphtheriebacillus entdeckt hatte, glaubte man, einen in Form, Größe, Wachstum und anderen biologischen Eigenschaften stets gleichartig auftretenden Mikroorganismus gefunden zu haben. Abgesehen von der individuellen Erkrankungsbereitschaft, die natürlich bei jeder Infektionskrankheit beträchtliche Verlaufsschwankungen bedingt, war aber die Diphtherieerkrankung auch innerhalb eng zusammenhängender Epidemien oft so verschiedenartig, daß die Annahme biologisch verschiedener Bacillentypen nahelag.

Im Rahmen der rein bakteriologischen Bearbeitung dieses Problems galt es vor allem, den Diphtheriebacillus von den diphterieähnlichen saprophytischen Bakterien, insbesonders den Pseudodiphtherie- und Xerosebacillen abzugrenzen. Nach Gins, Loeffler, v. Hofmann, Neißer und der Mehrzahl der Autoren sind die Diphtheriebacillen als selbständige Bakterienart von den Pseudodiphtherie- und Xerosebacillen zu trennen. Es gibt keine Uebergänge zwischen Diphtheriebacillen und Pseudodiphtheriebacillen. Allerdings ist Gins der Ansicht, daß man von einer Ueberschneidung der Formenkreise der Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen sprechen kann, diesen Arten, die bakteriologisch den Diphtheriebacillen nahestehen, jedoch apathogen sind und vielfach als Diphtheroide bezeichnet werden. In der jüngsten Vergangenheit handelte es sich nun darum, ob der virulente Diphtheriebacillus eine einheitliche Art darstellt oder ob er in verschiedenen Abarten oder Typen auftreten kann.

Von Typen darf man nach Clauberg, Gundel und Gotschlich nur dann sprechen, „wenn es sich um Bakterienstämme handelt, die in gewissen Hauptmerkmalen übereinstimmen und dadurch als Angehörige einer Art gekennzeichnet sind, daher auch, soweit sie pathogen sind, ein gleichartiges Krankheitsbild hervorrufen, bei denen aber andere, ebenfalls konstante Eigenschaften Verschiedenheiten aufweisen."

Schon Zupnik beobachtete zwei Unterarten des Diphtheriebacillus, die sich mit den später von Hammerschmidt unterschiedenen Arten A und C zu decken scheinen. Sie sind wahrscheinlich identisch mit dem Typus mitis und Typus intermedius des Diphtheriebacillus nach Anderson und Mitarbeitern.

Louis Martin, Werbrook, Wilson, Mc Daniel, Cobbett, Williams und Mann versuchten eine Typeneinteilung nach rein morphologischen Gesichtspunkten. Es ließen sich aber stets aus der einen Form auch die anderen entwickeln, so daß die morphologischen Eigenschaften nicht konstant und für eine Typeneinteilung geeignet waren.

Zahlreiche Autoren versuchten das serologische Verhalten der Stämme im Agglutinations- und Komplementbindungsversuch, andere wieder die Säurebildung aus verschiedenen Kohlehydraten, noch andere die hämotoxische Wirkung auf verschiedene Blutarten zur Unterscheidung einzelner Typen des Diphtheriebacillus heranzuziehen. Die Ergebnisse waren aber durchaus nicht einheitlich und lassen eine außerordentliche Variabilität dieser Eigenschaften erkennen.

Nach Schloßberger unterschieden auf Grund des serologischen Verhaltens Havens 2, Bull und Kliewe 3, Durand, Park, Williams und Mann, Christiansen und Hammerschmidt mindestens 5, Eagleton und Baxter sogar 10 Typen des Diphtheriebacillus. Hamschmidt teilte 1924 die Diphtheriebacillen in 3 reine Gruppen mit 2 Mischgruppen ein auf Grund der Kolonieform und -größe auf Agar, der Säure- und Alkalibildung in Bouillon, des serologischen Verhaltens und der Hämatoxinbildung. Diese Einteilung, ebenso die vorhergehenden haben in der Folgezeit keine Bedeutung erlangt, weil kein Zusammenhang mit den durch sie bedingten Erkrankungen in epidemiologischer, klinischer und therapeutischer Hinsicht bestand.

Erst durch die grundlegenden Arbeiten von Anderson, Happold, Mc Leod, Thomsen und Leeds begann ein neuer Abschnitt im Studium der Typenfrage beim Diphtheriebacillus. Sie züchteten Diphtheriestämme auf einem Kaliumtellurit-Kaninchenblutnährboden, der in 90% der Kulturen von Halsabstrichen nach 18/24 Stunden Bebrütung eine Entscheidung gestattete. Diese Autoren wiesen 3 Kolonieformen nach, die bei der Weiterzüchtung der Stämme auch auf anderen Nährböden eine beträchtliche Konstanz besitzen, und die hinsichtlich des Wachstums, der Säurebildung in Bouillon und des Verhaltens gegenüber Kohlehydraten besonders charakterisiert sind. Sehr wichtig ist noch die Beobachtung Andersons und seiner Mitarbeiter, daß bei den einzelnen Diphtherieerkrankungen ein enger Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf und dem Typus des gefundenen Diphtherie-

bacillus besteht. So käme auch der Feststellung des Typus prognostische Bedeutung zu.

Anderson und Mitarbeiter unterscheiden 3 Typen: Typus gravis, Typus mitis, Typus intermedius. Nach der Originalarbeit von Anderson usw., nach Schloßberger und Hettche sind die 3 Typen folgendermaßen gekennzeichnet:

Der Typus gravis kommt in der Regel bei schweren toxischen Krankheitsfällen vor. Er wächst in Fleischbrühe unter Bildung einer Oberflächenhaut und eines krümligen Bodensatzes; dabei schlägt die ursprünglich saure Reaktion der Bouillon binnen 48 Stunden nach der alkalischen Seite um. Er wächst auf Kaliumtelluritnährböden üppig und bildet große, graue bis grauschwarze, flache, glänzende, zackig begrenzte Kolonien, die an das Aussehen eines Gänseblümchens erinnern. Er vergärt Traubenzucker, Galaktose, Maltose, Dextrin, Glykogen, Stärke stark, nicht dagegen Saccharose. Er hämolysiert Kaninchen- und Menschenerythrocyten, nicht dagegen Rinderblutkörperchen.

Der Typus mitis findet sich gehäuft bei den milder verlaufenden Krankheitsfällen, bei denen es jedoch zu ausgedehnter Membranbildung mit ernster Intoxikation kommen kann und kann wahrscheinlich infolge laryngealer Membranbildung und Atmungsbehinderung höchst gefährlich sein (Anderson). Er tritt ferner häufig bei Nasendiphtherie auf, sowie bei Bacillenträgern. In Bouillon wächst er unter einheitlicher Trübung, die saure Reaktion bleibt hier 3—5 Tage bestehen; auf Kaliumtelluritnährböden wächst er in Form runder, schwarzer, glänzender Kolonien. Er vergärt Glucose, Galaktose, Maltose, nicht aber Polysaccharide. Kaninchen-, Rinder- und Menschenblutkörperchen werden hämolysiert.

Nach Anderson gibt es noch 5—10% Zwischenformen, die größtenteils als Typus intermedius anzusprechen sind, und die auch bezüglich des Krankheitsverlaufes eine Mittelstellung einnehmen. Dieser Typus zeigt nach Schloßberger folgende Eigenschaften: In Bouillon entsteht eine feingranulierte Trübung, die sich rasch absetzt. Nur selten bildet sich eine Oberflächenhaut. Die saure Reaktion bleibt mehr als 3 Wochen bestehen. Auf dem Kaliumtelluritnährboden sind die Kolonien klein, flach, mit einem zentralen schwarzen Knopf. Glucose, Galaktose, Maltose werden vergoren, nicht dagegen Saccharose und die Polysaccharide. Seine Stämme wirken anhämolytisch.

Carter H. S. untersuchte 510 Diphtheriestämme und konnte die Einteilung von Anderson und Mitarbeitern in die 3 Typen bestätigen. Von den untersuchten Stämmen waren 99% nach dem Koloniebild, der Stärkereaktion und dem Bouillonwachstum den genannten Typen zuzuordnen und erwiesen sich als konstant. Er beobachtete, daß in Gegenden, in denen die Diphtherie mild verläuft, der Gravis selten war. Wo der Intermediustyp vorherrschte, war die Diphtheriesterblichkeit geringer als dort, wo vor allem der Gravistyp anzutreffen war. Christison diagnostizierte von 7 Todesfällen 6 als Gravis, 1 als Intermedius, Mc Leod von 40 Todesfällen 35 als Gravis, Preuner in Königsberg alle Todesfälle als Gravis.

Die Befunde von Anderson und Mitarbeitern wurden von zahlreichen englischen und schottischen Autoren, u. a. Christison und Robinson, später auch von deutschen Autoren, so Gundel und Tietz in Berlin, die 200 Stämme auf verschiedenen Nährböden züchteten, Gundel und Liebetruth in Aachen, Duisburg, von Hettche in Königsberg nachgeprüft und bestätigt.

Von Parish, Rosinson, Gundel und Liebetruth wurde festgestellt, daß der Typus Gravis auch bei leichten Diphtherieerkrankungen anzutreffen ist und ebenso der Typus mitis bei schweren Diphtherieerkrankungen. Dies erklärt Schloßberger so, daß je nach der Resistenz des betroffenen Makroorganismus ein hochvirulenter Gravisstamm bei einem sehr resistenten Organismus gar keine, ein Mitisstamm anderseits bei einem wenig resistenten Körper schwere Erscheinungen hervorrufen kann. Weil auch der Typus mitis Todesfälle und schwere Erkrankungen hervorrufen kann, lehnen Hilgers und Thoenes die Bedeutung der Typen für den klinischen Krankheitsverlauf ab. Ihnen schließen sich auch andere Autoren an.

Hinsichtlich der Verteilung der einzelnen Typen in den verschiedenen Ländern ergaben sich wesentliche Unterschiede. In Leeds, Hull und Deutschland überwog der Typus gravis mit 59—79% (Schloßberger). Christison, May H. fanden bei Untersuchungen in Berlin von 184 Fällen im Sommer 1933 66,3% Typus gravis, es waren schwere Fälle, 6 von 7 verliefen tödlich, bei allen Erkrankungen traten Lähmungen auf; 13,6% Typus mitis, von denen sich die Mehrzahl bei Nasendiphtherie oder Bacillenträgern fand; 12% Typus intermedius. In Dundee fanden sich nur 3,7%, in Glasgow

1,9% Gravisstämme (Schloßberger), dafür war hier der Anteil an Mitis- und Intermediusstämmen höher.

Die 3-Teilung der Typen wurde allgemein beibehalten. Vor allem in Gegenden, in denen die Diphtherie milder verlief, wurden auch atypische Formen festgestellt, die nicht in eine der 3 Gruppen eingeordnet werden konnten. So fanden Christison in Berlin 8,1%, Gundel und Liebetruth 11%, Robinson in Manchester von 542 untersuchten Fällen 1,5%, in Hull Leete 2,3% atypische Kulturen.

Robinson überimpfte zur Prüfung der Virulenz 110 Diphtherietypenstämme intracutan auf Meerschweinchen und stellte fest, daß 7 Gravis-, 5 Mitis-, 14 Intermediusstämme starke, 17 Gravis-, 12 Mitis-, 29 Intermediusstämme schwache, 3 Gravis-, 3 Mitis-, 7 Intermediusstämme sehr schwache Reaktion ergaben. 7 Stämme gaben zweifelhafte Ergebnisse, 6 Stämme zeigten negativen Verlauf.

Die ursprünglich angenommene Konstanz der verschiedenen Eigenschaften der einzelnen Diphtherietypen konnte nach Untersuchungen einiger Autoren nicht immer festgestellt werden. Es ergab sich eine gewisse Veränderlichkeit der Eigenschaften, besonders bei Fortzüchtung der Kulturen in Bouillon (Schloßberger). Christison und Robinson konnten eine Veränderlichkeit des hämotoxischen Verhaltens beobachten, das Verhalten gegenüber Stärke war unverändert.

Anderson und Mitarbeiter, Christison, Schiff, Werber fanden bei Patienten, die in gewissen Zeitabständen bakteriologisch untersucht wurden, fast stets den gleichen typischen oder atypischen Diphtheriestamm, was für eine erhebliche Stabilität der einzelnen Typen in vivo spricht. Schiff und Werber beobachteten ferner eine Typenkonstanz bei Geschwistern.

Das Auftreten atypischer Diphtheriestämme wurde bisher als Variabilitätserscheinung betrachtet. Hammerschmidt führt das Auftreten dieser Stämme aber auf eine Mischung von 2 Formen zurück, von denen einmal die eine, dann die andere überwiegt. Ausgehend von seinen 1924 festgestellten Typen A, B, C, wobei A wahrscheinlich dem Mitis, B dem Gravis und C dem Intermedius der englischen Forscher entspricht, konnte er die C-Form in reiner Linie fortführen, während bei den A- und B-Stämmen auf einem sog. Hungeragar neben den typischen A- und B-Kolonien immer auch C-Formen auftraten. Er zieht den Schluß, daß die C-Form

auch allein einen Diphtheriestamm bilden kann, die Typen A und B dagegen aus einem C-Grundstock und A- bzw. B-Anteilen bestehen. Unter günstigen Bedingungen, wie blut- oder serumhaltigen Nährböden, kommen nur einheitliche Kolonien entsprechend den Typen A, B, C zur Entwicklung.

Diese Ansicht Hammerschmidts wird durch Versuche Claubergs bestritten, weil nach Claubergs Ansicht Hammerschmidt keine Einzelkulturen verwandt hatte. Clauberg konnte ausgehend von Einzelkulturen feststellen, daß trotz einer gewissen Neigung zu Veränderlichkeit im Koloniebild bei Untersuchung der Typen Gravis, Mitis, Intermedius kein Anhalt für eine fehlende Typenkonstanz vorhanden ist. Durch weitere Versuche wurde bewiesen, daß eine Einzelkultur nur einen Typ bilden kann, nicht aber, daß sich der einzelne Diphtheriestamm nur aus einem Typ zusammensetzt.

Hettche will durch Feststellung des zeitlichen Ablaufes der ph-Aenderung in einer 1%igen Saccharosebouillon, wodurch eine scharfe Charakterisierung der einzelnen Typen möglich sein soll, 6 Typen unterschieden wissen. Diese lassen sich in 2 Hauptgruppen aufteilen. Hettche zeigte ferner, daß die Umwelteinflüsse auf die Form der Diphtheriebacillen modificierend wirken. So beobachtete er eine gesteigerte Polkörperchenbildung bei niedrigen Bebrütungstemperaturen. Ferner sah er ein Nachbarwachstum, das ein erstaunlich wechselvolles Bild ergab, wenn er in 3 mm Entfernung Staph. citreus, Sarcine, Bact. pyocyaneum, Bact. coli und Hefe anlegte. Eine Ueberimpfung auf Blutplatten führte meist zur Ausgangsform zurück.

Murray teilte 166 Diphtheriestämme in Typen auf und teilt die Typen Gravis und Intermedius wieder in je 2 Gruppen auf.

Wright, Helen A., May H., Christison, A.L.K. Rankin, R.C.M. Pearson, J.A. Cuthbert beobachteten neben den bekannten 3 Typen (I, II, III) noch 3 neue, von denen der erste neue (IV) Stärke nicht angriff und avirulent war, der 2. neue (V) Stärke fermentierte und avirulent war, der 3. neue (VI) Stärke unverändert ließ und avirulent war. Von 469 Fällen gehörten 0,9% dem Gravis (I), 18,3% dem Mitis (II), 56,3% dem Intermedius (III), 3,4% dem Typ IV, 2,1% dem Typ V und 11,1% dem Typ VI an. Nicht klassificierbar waren 7,9%.

Pesch bestätigte an Hand von 2610 Rachen- und Nasenabstrichen das Vorkommen der 3 bekannten Typen. Er

glaubte hierbei feststellen zu können, daß nach 4—6 Wochen regelmäßig eine Umwandlung des Intermediustyps in den Mitistyp eintrat. Gravis- und Mitisformen zeigten dagegen noch nach 6 Monaten keine Umwandlung. Diese Veränderung des Intermediustyps ließ sich bei wochenlanger täglicher Ueberimpfung auf frische Loefflerplatten sowie nach 6-facher Meerschweinchenpassage nicht rückgängig machen.

Gundel referiert über Arbeiten von Grubb, Thomas über die Variabilität im Erscheinungsbild der Diphteriebacillen, die unter Berücksichtigung von Kokken- und Stäbchenformen sehr ausgesprochen sein soll, vor allem, wenn die Stämme in Nährböden verschiedener Zusammensetzung überführt werden. Die Kokkenformen bestimmter Stämme wurden besonders in Leberhaltigen Nährböden erhalten. Es konnte sogar makroskopisch die Ueberführung der einen in die andere Form beobachtet werden.

Von einer Umwandlung der Stäbchen- in die Kokkenform und ihre Rückführung indie Ausgangsform berichtet Favia N. Bei Züchtung auf Bouillon mit Zusatz von 0,01%iger Kupfersulfatlösung verlieren die Diphtheriebacillen die Stäbchenform und erscheinen nach 2—3 solchen Passagen als Kokken ohne Polkörner. In diesem Zustand sind sie avirulent. Nach wenigen Stunden Wachstum auf den gewöhnlichen Nährböden erlangen sie die ursprüngliche Form und Virulenz wieder.

Erzin berichtet, daß unter geeigneten Versuchsbedingungen gelegentlich eine Varietätenbildung der Diphtherietypen möglich sei, die aber stets zum Ausgangstyp zurückgeführt werden konnten. Dies spricht also für die Konstanz der Typen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß an dem Bestehen der Typen Gravis, Mitis, Intermedius kein Zweifel mehr besteht, wenn auch durch künstliche Manipulationen gewisse Varianten zu erzielen und in einem geringen Prozentsatz atypische Stämme nicht einzuordnen sind. Man kann zwar nicht ohne weiteres aus dem Typus auf die Schwere der Erkrankung schließen, da ja auch die Konstitution und Disposition des Organismus mitspricht. Jedoch verlaufen in der Regel Gravis- und Intermedius-Erkrankungen schwerer mit fast 100%igem Anteil an den Todesfällen, während der Typus mitis leichtere Erkrankungsfälle mit selten tödlichem Ausgang hervorruft.

Nachdem man diese Parallelen zwischen Krankheitsverlauf und kulturellem Verhalten der Diphtherietypen beobachtet

hatte, suchte man auch experimentell biologische Unterschiede zu ermitteln. Gundel, Niyazi, Erzin stellten fest, daß bei experimentellen Meerschweincheninfektionen deutliche Unterschiede im Krankheitsbild der 3 Typen hinsichtlich ihrer Toxizität erkennbar waren. Beim Typus gravis trat bald der Tod der Tiere ein, die inneren Organe waren von Diphtheriebacillen überschwemmt. Der Typus intermedius führte später als der Typus gravis zum Tod der Tiere, Diphtheriebacillen waren in allen Organen nachweisbar. Der Typus mitis führte zu Spättodesfällen, Diphtheriebacillen wurden in den inneren Organen meist vermißt. Für ein „unterschiedliches Invasionsvermögen" spricht auch die Beobachtung, daß bei inficierten, aber frühzeitig getöteten Tieren positive Organbefunde nur beim Typus gravis und intermedius bereits nach 3—6 Stunden zu erheben waren, nicht dagegen beim Typus mitis.

Nach Anderson ist der Gravis der Erreger der epidemischen Diphtherie, Mitis der Erreger der sporadisch-endemischen Fälle. Das Vorkommen der einzelnen Typen scheint auch lokal verschieden zu sein. Der Diagnose der Typen scheint besonders für die spät erkannten Diphtheriefälle prognostische Bedeutung zuzukommen.

Das Verhalten der Typen Gravis, Mitis, Intermedius gegen Temperatureinflüsse und chemische Stoffe.

A. Auf Grund der verschiedenen biologischen Eigenschaften der 3 Typen des Diphtheriebacillus war es von besonderem Interesse festzustellen, ob durch äußere Einflüsse diese Typen beeinflußt und vor allem unterschiedlich beeinflußt werden. Diese Dinge näher zu beleuchten, war der Sinn der vorliegenden Arbeit. Denn in der Literatur findet man nur Angaben dieser Art, die sich ganz allgemein auf den Diphtheriebacillus beziehen. Die Versuche wurden also zu einer Zeit angestellt, als die Typeneinteilung noch nicht feststand.

Gegenüber höheren Temperatureinflüssen sind die Diphtheriebacillen nach Brieger und Fränkel, Roux und Yersin wenig widerstandsfähig. Jenseits von 50° sterben sie in weniger als 1 Stunde ab, soweit sie aus Kulturen stammen. Bei Einwirkung von Untertemperaturen —225° 10 Stunden lang nach Macfadyen und Rowland, auch bei wechselndem Einfrieren und Auftauen blieben sie lebensfähig.

Gegenüber den gebräuchlichen Desinfektionsmitteln sind

die Diptheriebacillen nicht widerstandsfähiger als die Wuchsformen anderer Bakterienarten. 1%ige Carbolsäure tötet nach etwa 1 Minute; 1‰ige Sublimatlösung soll nach Bechhold in 1 Minute töten, ß-Naphthol und Tribrom-ß-Naphthol ebenfalls in 1 Minute. Innerhalb von 3 Minuten tötet 1%ige Wasserstoffsuperoxydlösung.

Dittharn prüfte ein Kresolpräparat „Favestol" und fand die Diphtheriebacillen nach der Suspensionsmethode in 0,5% Favestol nach 5 Minuten abgetötet. Bertarelli hat Lysoformium densum verwendet und beobachtet, daß die Diphtheriebacillen in 5%iger Lösung nach 1 Stunde, in 10%-tiger Lösung nach 30 Minuten noch am Leben waren.

An chemotherapeutischen Substanzen prüfte Schaeffer das Morgenrothsche Eukupin. Er zeigte, daß eine Verdünnung 1 : 50 000 die Entwicklung der Diphtheriebacillen in flüssigen Nährböden hemmt, bei 1 : 2000 — 1 : 8000 eine Abtötung nach einigen Minuten eintritt. Gegenüber Akridinderivaten verhielten sich die Diptheriebacillen wenig resistent. Trypaflavin tötet sie in Suspension bei einer Verdünnung von 1 : 1000 nach 30 Minuten ab, eine Entwicklungshemmung tritt schon ein bei 1 : 500 000 — 1 : 1 Million. Reinhardt zeigte, daß das Trypaflavin die Bakterien nicht nur in Kulturen, sondern auch im Tierversuch beeinflußt. Bei Injektion der achtfach tödlichen Dosis mit einer Trypaflavinverdünnung 1 : 1000 wurden die Diphtheriebacillen abgetötet, bei 1 : 10 000 trat nur ein örtliches Infiltrat auf, und die Tiere blieben am Leben.

An Substanzen, die die Diphtheriebacillen beeinflussen, aber keine eigentlichen Desinfektionsmittel sind, prüften Emmerich und Loew die Pyocyanase. Die Diphtheriebacillen werden, bei Einwirkung von 1 ccm davon auf 0,2 ccm Diphtheriebouillonkultur, nach 10 Minuten abgetötet.

Seiffert prüfte das Verhalten in 50%iger Glycerinlösung, die mit Eiweiß versetzt war und stellte fest, daß die Diphtheriebacillen in dieser Lösung bei 37° schon nach 1 Tag nicht mehr lebten.

B. Eigene Versuche:

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob die 3 Typen der Diphtheriebacillen bei Einwirkung verschiedener chemischer Stoffe und Temperaturen gleichzeitig oder zu verschiedener Zeit abgetötet werden. Zu dieser Fragestellung berechtigten die verschiedenen Eigenschaften de. 3 Typen; Voraussetzungen bei den Versuchen waren:

1. Reine Gravis-, Mitis-, Intermediusstämme, die im hiesigen Institut vorhanden waren.
2. Anwendung der gleichen Stämme für alle Versuche, damit eindeutige Vergleichsergebnisse erhalten werden konnten.
3. Variation der Konzentration der chemischen Stoffe (bzw. der Temperatur), denen die einzelnen Stämme der Typen ausgesetzt wurden.
4. Variation der Zeit der Einwirkung der einzelnen Stoffe auf die Typenstämme.

Im allgemeinen wurden je 5 Gravis-, Mitis- und Intermediusstämme bei einem Versuch gleichzeitig den angeführten Einflüssen ausgesetzt. Die Stämme wurden im Beginn der Versuche mehrmals über Loeffler-, danach über Blutagarplatten geschickt. Ausgehend von gut gewachsenen Einzelkulturen der Blutagarplatten wurden diese Typenstämme aller 3 Tage in 3-facher Verdünnung auf frische Blutagarplatten ausgestrichen und im Thermostaten von 37° C. 48 Stunden lang bebrütet. So standen jederzeit gutgewachsene Kulturen der Typenstämme zur Verfügung.

Bei allen Versuchen wurde entweder:

1. eine Fleischwasserbouillonkultur benutzt, die durch Überimpfen einer Kultur eines Stammes von der Blutagarplatte auf 10 ccm Fleischwasserbouillon und 24 stündige Bebrütung bei 37° C. erhalten wurde, und von der jeweils 0,1 bzw. 0,2 ccm zur Reaktion gelangten, oder:
2. eine Öse voll der Stammkulturen von der Blutagarplatte direkt in die Reaktionslösung gebracht.

Nach dem Verbleib in der Reaktionslösung wurden zur Kontrolle, ob eine Abtötung der Typenbacillen erfolgt ist oder nicht, jeweils 0,2 ccm dieser Lösung zu 10 ccm Fleischwasserbouillon gebracht, 24 Std. bebrütet und davon stets eine Öse voll auf Clauberg- bzw. Blutagarplatten ausgestrichen. Im Zweifelsfall wurde noch ein nach Neißer gefärbtes Präparat angefertigt und mikroskopisch untersucht.

I. Wirkung verschiedener Temperaturen auf die 3 Typen:

Ausführung:

Jeweils 2 ccm Diphtheriebouillon wurden bei wechselnden Zeiten bestimmten Temperaturen im Wasserbad ausgesetzt, 0,1 ccm danach auf 10 ccm Bouillon überimpft, 48

Stunden bebrütet, auf Claubergplatten ausgestrichen, 48 Stunden bebrütet.

1. Versuch: bei 70° C.

Bei dieser Temperatur zeigten je 5 Stämme der 3 Typen schon nach 5 Minuten vollkommene Abtötung.

2. Versuch: bei 56° C.

Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist, wurden 2 Gravisstämme nach 15' abgetötet, 2 Mitisstämme schon nach 3', 2 Intermediusstämme nach 5'.

	*) nach:	1'	3'	5'	15'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	—	—	—
	2. Stamm:	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	—	—	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	—	—

3. Versuch: bei 48° C.

Die folgende Tabelle zeigt, daß 1 Gravisstamm nach 60', 2 Mitisstämme nach 30' und 1 Intermediusstamm nach 30' abgetötet waren.

---

*) + bedeutet: gewachsen; — bedeutet: abgetötet.

	nach:	5'	15'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	—	—
	5. Stamm:	+	+	+	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	—	—
	5. Stamm:	+	+	+	—

Ergebnis:

Die Temperaturversuche bei 48° C., am besten bei 56° C. zeigen deutlich, daß sich der Gravistyp am schwersten, der Mitistyp am leichtesten abtöten läßt; der Typus Intermedius nimmt eine Mittelstellung ein.

II. Wirkung von n/10-Salzsäure auf die 3 Typen:

Ausführung:

Jeweils zu 5 ccm Aqua dest. wurde eine bestimmte Menge n/10-Salzsäure und 1 Oese Diphtheriebacillen zugegeben, wechselnde Zeiten einwirken gelassen, 0,1 ccm danach auf 10 ccm Bouillon überimpft, 48 Stunden bebrütet, auf Clauberg-platten ausgestrichen, nach 48 Stunden Bebrütung abgelassen.

1. Versuch:

5 ccm Aqua dest., dazu ½ ccm n/10-Salzsäure, sonst wie oben angeführt.

3 Gravisstämme waren nach 30', ein Mitisstamm schon nach 5', 2 Intermediusstämme nach 15' abgetötet.

	nach:	5'	15'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	—
Mitis:	1. Stamm:	—	—	—	—
	2. Stamm:	+	—	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	—	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	—	—	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	—	—
	5. Stamm:	+	—	—	—

2. Versuch:

5 ccm Aqua dest., dazu ½ ccm n/10-Salzsäure, sonst wie vorher; nur unter anderer Zeiteinteilung.

	nach:	1'	3'	5'	15'	30'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+	—
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	+	—	—	—
	3. Stamm:	+	+	—	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	—	—
	5. Stamm:	+	+	+	—	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	+	—

1 Gravisstamm war nach 3', 2 Mitisstämme nach 5' und 3 Intermediusstämme nach 15' abgetötet.

3. Versuch:

5 ccm Aqua dest., dazu 2 ccm n/10-Salzsäure, sonst wie vorher.

	nach:	5'	15'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	—	—	—	—
	2. Stamm:	+	-	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	--	—	—
	5. Stamm:	—	—	-	—
Mitis:	1. Stamm:	—	—	—	—
	2. Stamm:	+	—	-	—
	3. Stamm:	+	—	—	—
	4. Stamm:	—	—	—	—
	5. Stamm:	—	—	—	—
Intermedius:	I. Stamm:	+	+	—	- -
	2. Stamm:	—	—	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	—	—	—	--
	5. Stamm:	—	—	—	—

Bei dieser Konzentration der Salzsäure sind je 2 Gravis-, Mitis-, Intermediusstämme schon nach 5' abgetötet. Die Ergebnisse sind nicht sehr eindeutig.

Ergebnis:

Diese Versuche mit Salzsäure lassen deutlich erkennen, daß der Typus Gravis am schwersten abzutöten ist, der Typus Mitis am leichtesten; der Typus Intermedius nimmt eine Mittelstellung ein. Am deutlichsten zeigen dies die Versuche 1 und 2, der 3. Versuch ist nicht so eindeutig.

III. Wirkung von n/10-Natronlauge auf die 3 Typen:

Ausführung:

Jeweils zu 5 ccm Aqua dest. wurde eine bestimmte Menge n/10-Natronlauge gegeben, dazu eine Oese Diphtheriebacillen, wechselnde Zeiten einwirken gelassen, 0,1 ccm danach auf 10 ccm Bouillon überimpft, 48 Stunden bebrütet, auf Clauberg-platten ausgestrichen, nach 48stündiger Bebrütung abgelesen.

1. Versuch:

Zu 5 ccm Aqua dest. ½ ccm n/10-NaOH, dazu 1 Oese Diphtheriebacillen, sonst wie oben.

Nach 5, 15, 30, 60 Minuten waren je 5 Stämme vom Typus Gravis, Mitis und Intermedius noch gewachsen.

2. Versuch:

Zu 5 ccm Aqua dest. 2 ccm n/10-NaOH und 1 Oese Diphtheriebacillen, sonst wie vorher.

Nach 5, 15, 30, 60 Minuten waren je 5 Stämme von allen 3 Typen noch gewachsen.

3. Versuch:

Zu 1½ ccm n/10-NaOH wurde 1 Oese Diphtheriebacillen gebracht, weiter wie vorher verfahren.

	nach:	5'	15'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4 Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm;	+	+	+	+

2 Gravisstämme waren nach 30', 1 Mitisstamm nach 60' und 1 Intermediusstamm nach 60' abgetötet.

Ergebnis:

Aus den Ergebnissen dieser 3 Versuche kann kein Schluß auf ein unterschiedliches Verhalten der 3 Typen gegenüber n/10-NaOH gezogen werden.

IV. Wirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf die 3 Typen:

Ausführung:

0,1 ccm Diphtheriebouillon wurden zu 2 ccm einer bestimmt konzentrierten Wasserstoffsuperoxydlösung gegeben, nach wechselnden Zeiten 0,1 ccm davon auf 10 ccm Fleisch-

wasserbouillon überimpft, 48 Stunden bebrütet, auf Claubergplatten ausgestrichen und nach 48stündiger Bebrütung abgelesen.

1. Versuch:

mit 3%igem Wasserstoffsuperoxyd.

Je 5 Stämme der 3 Typen wurden in 3%iges Wasserstoffsuperoxyd gebracht und weiter, wie oben angeführt, behandelt. Nach 15', 30', 1 Std., 2 Std., 3 Std. waren alle Stämme abgetötet.

2. Versuch:

mit 3%igem Wasserstoffsuperoxyd.

Ansatz wie bei Versuch 1. Nach 1, 3, 5, 15, 30 Minuten waren alle Typenstämme abgetötet.

3. Versuch:

mit 2%igem Wassersttoffsuperoxyd.

Ansatz wie bei Versuch 1.

	nach;	5'	15'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	—
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	—	—
	5. Stamm:	+	+	+	+
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	—	—	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	—	—	—

1 Gravisstamm ist nach 60', 1 Mitisstamm nach 30' und 2 Intermediusstämme sind schon nach 15' abgetötet.

4. Versuch:

mit 1%igem Wasserstoffsuperoxyd.

Ansatz wie bei Versuch 1.

	nach:	1'	3'	5'	15'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	+
Intermedius:	I. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	+

Von den Gravisstämmen waren nach 15' noch alle am Leben; 1 Mitisstamm war nach 5', ein 2. nach 15' und 1 Intermediusstamm nach 15' abgetötet.

Ergebnis:

Ein unterschiedliches Verhalten der 3 Typen gegenüber Wasserstoffsuperoxyd scheint nach dem 3. und 4. Versuch zu bestehen, der Gravis scheint am schwersten abzutöten zu sein; über einen Unterschied der Abtötungsgeschwindigkeit der beiden anderen Typen ergeben die Versuche kein klares Bild.

V. Wirkung von Carbolsäure auf die 3 Typen.

Ausführung:

0,1 ccm Diphtheriebouillon (bzw. 1 Oese Diphtheriebacillen einer Blutagarkultur) wurden in wechselnden Zeiten zu 2 ccm einer bestimmt konzentrierten Carbolsäurelösung gegeben, 0,1 ccm davon auf 10 ccm Fleischwasserbouillon überimpft, 48 Std. bebrütet, auf Claubergplatten ausgestrichen, nach 48 Std. Bebrütung abgelesen.

1. Versuch: mit 3%iger Carbolsäure.

Je 5 Stämme der 3 Typen wurden in eine 3%ige Carbolsäurelösung gebracht. Versuchsverlauf wie oben beschrieben. Nach 1', 3', 5', 15' waren alle Stämme getötet.

2. Versuch: mit 1%iger Carbolsäure.

Ansatz wie bei Versuch 1. Nur 1%ige Carbolsäure verwendet. Nach 1', 3', 5', 15' war alles abgetötet.

3. Versuch: mit 0,5%iger Carbolsäure.

Ansatz wie bei Versuch 1. Nur 0,5%ige Carbolsäure verwendet.

	nach:	1'	3'	5'	15'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	+
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	—

Nach 15' war kein Gravis-, nach 5' 1 Mitis- und nach 15' 1 Intermediusstamm abgetötet.

4. Versuch: mit 0,5%iger Carbolsäure.

Ansatz wie bei Versuch 3. Nur größere Zeitintervalle.

	nach;	10'	20'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	—	—
	5. Stamm:	+	+	+	—
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	—	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	—	—

Nach 30' war 1 Gravis-, nach 60' waren alle Gravisstämme getötet; nach 30' war 1 Mitis-, nach 60' 3 von 4 Mitisstämmen abgestorben; nach 30' waren 2, nach 60' alle Intermediusstämme abgetötet.

5. Versuch: mit 0,5 %iger Carbolsäure.

Ansatz wie vorher, nur an Stelle von Diphtheriebouillon wurde je 1 Oese Diphtheriebacillen zugesetzt.

	nach:	10'	20'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	—

Nach 60' waren noch alle Gravisstämme am Leben; nach 30' waren 3, nach 60' alle Mitisstämme abgestorben; von den Intermediusstämmen waren nach 30' 1, nach 60' von 5 Stämmen 4 abgetötet.

Ergebnis:

Aus dem 3. und 4. Versuch, besonders aber aus dem 5. Versuch geht es klar hervor, daß auch gegenüber der Carbolsäure der Gravistyp am resistentesten, der Mitistyp am wenigsten resistent ist und der Intermediustyp eine Mittelstellung einnimmt.

VI. Wirkung von Trypaflavin auf die 3 Typen:

Nach Angabe der „Bayerwerke-Leverkusen", Arbeit von Neufeld, Schiemann und Baumgarten, werden Diphtheriebacillen durch Trypaflavin = 3,6 — Diamino — 10-methylacridiniumchlorid, bei einer Konzentration des Farbstoffes von 1 : 100 000—300 000 nach 24 Std. abgetötet.

Ausführung:

Diphtheriebouillon bzw. 1 Oese Diphtheriebacillen wurde mit Trypaflavinlösung versetzt und unter Wahrung einer bestimmten Endkonzentration des Farbstoffes die Einwirkungszeit verändert. Danach wurden 0,1 ccm davon auf 10 ccm Bouillon überimpft, 48 Std. bebrütet, auf Claubergplatten ausgestrichen, nach 48 Std. Bebrütung abgelesen.

1. Versuch:

Endkonzentration von Trypaflavin 1 : 300 000.

0,2 ccm Diphtheriebouillon wurden mit 0,8 ccm Bouillon und 1 ccm Trypaflavinlösung 1 : 150 000 versetzt; die Endkonzentration beträgt also 1 : 300 000. Weitere Ausführung wie oben beschrieben. Nach 1', 3', 5', 15', 30', 24 Std. waren je 5 Gravis-, Mitis-, Intermediusstämme noch nicht abgetötet.

2. Versuch:

Endkonzentration von Trypaflavin 1 : 10 000.

0,2 ccm Diphtheriebouillon wurden mit 0,8 ccm Bouillon und 1 ccm Trypaflavinlösung 1 : 5000 versetzt, also Endkonzentration 1 : 10 000. Weitere Ausführung wie oben beschrieben. Nach 5', 15', 30', 1 Std., 24 Std. waren je 5 der angesetzten Gravis-, Mitis- und Intermediusstämme abgetötet.

3. Versuch:

Endkonzentration von Trypaflavin 1:100000.

1 Öse auf Blutagar gewachsener Diphtheriebacillen wurden in 3 ccm einer 1:100000 Trypaflavinlösung gebracht. Ausführung weiter wie oben beschrieben. Nach 5', 15', 30', 60' waren je 5 der angesetzten Gravis-, Mitis- und Intermediusstämme noch am Leben, nach 24 Std. waren alle abgetötet.

4. Versuch:

Endkonzentration von Trypaflavin 1:50000.

1 Öse auf Blutagar gewachsener Diphtheriebacillen wurden in 3 ccm einer 1:50000 Trypaflavinlösung gebracht. Ausführung weiter wie oben beschrieben. Nach 5', 15', 30', 60' waren je 5 der angesetzten Gravis-, Mitis- und Intermediusstämme noch am Leben, nach 24 Std. waren alle abgetötet.

5. Versuch:

Endkonzentration von Trypaflavin 1:25000.

1 Öse auf Blutagar gewachsener Diphtheriebacillen wurden in 3 ccm einer 1:25000 Trypaflavinlösung gebracht. Ausführung weiter wie oben beschrieben. Nach 1, 2, 5, 7 Stunden waren je 2 angesetzte Gravis-, Mitis- und Intermediusstämme noch gewachsen, nach 24 Stunden waren alle abgetötet.

6. Versuch:

Endkonzentration von Trypaflavin 1:10000.

1 Öse auf Blutagar gewachsener Diphtheriebacillen wurden in 3 ccm einer 1:10000 Trypaflavinlösung gebracht. Ausführung weiter wie oben beschrieben.

	nach:	1'	3'	5'	15'	30'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	—	—
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	+	
	2. Stamm:	+	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—	—
	4 Stamm:	+	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	+	+
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	—	—
	2 Stamm:	+	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	+	+	—
	5. Stamm;	+	+	+	+	+

Nach 15' waren 1 Gravisstamm, 2 Mitis- und 3 Intermediusstämme abgetötet; nach 30' waren 3 Gravis- und je 4 Mitis- und Intermediusstämme abgetötet.

Ergebnis:

Aus dem Versuch 2—5 ist eindeutig zu ersehen, daß die verschiedenen Typen bei 1 : 100 000 und höheren Konzentrationen von Trypaflavin nach 24 Stunden abgetötet sind. Der letzte Versuch zeigt ein schon früheres Absterben der Typen bei einer Konzentration von 1 : 10 000 an Trypaflavin; ein unterschiedliches Verhalten der 3 Typen gegenüber Trypaflavin kann aus den Versuchen nicht geschlossen werden.

VII. **Wirkung von Targesin auf die 3 Typen:**

Ausführung:

Zu einer Targesinlösung wurde Diphtheriebouillon bezw. 1 Öse Diphtheriebacillen gebracht, die Einwirkungszeit verändert, 0,1 ccm davon auf 10 ccm Bouillon überimpft, 48 Std. bebrütet, auf Claubergplatten ausgestrichen, nach 48 Std. Bebrütung abgelesen.

1. Versuch:

mit 1%iger Targesinlösung:

Zu 2 ccm 1%iger Targesinlösung wurde 0,1 ccm Diphtheriebouillon zugegeben. Weitere Ausführung wie oben beschrieben.

	nach:	1'	3'	5'	15'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	—

Nach 15' waren alle Gravisstämme noch am Leben, während 3 Mitis- und 4 Intermediusstämme bereits getötet waren.

2. Versuch:

mit 5%igem Targesin:

Zu 2 ccm 5%iger Targesinlösung wurde 1 Öse Diphtheriebacillen gegeben. Ausführung wie oben beschrieben. Nach 5', 15', 30', 60', 2 Std. waren je 5 Gravis-, Mitis- und Intermediusstämme abgetötet.

Ergebnis:

Die Versuche zeigen, daß Targesin die Diphtheriebacillen abtöten kann, nicht aber, ob sich die 3 Typen unterschiedlich gegenüber Targesin verhalten. Aus dem 1. Versuch ist lediglich zu sehen, daß der Gravistyp am resistentesten zu sein scheint.

VIII. **Wirkung von Mucidan auf die 3 Typen:**

Ausführung:

Mucidan (Rhodankalium, Hexamethylentetramin, Ol. Pin. silv.) — als keimtötendes Mittel von Kali Chemie A.-G. Berlin hergestellt — wird mit Bouillon so vermischt, daß die gewünschte Mucidankonzentration erhalten wird. Dazu kommt

1 Öse Diphtheriebacillen, nach wechselnden Einwirkungszeiten werden 0,1 ccm der Lösung auf 10 ccm Bouillon überimpft, 48 Std. bebrütet, auf Blutagarplatten ausgestrichen, nach 48 Std. Bebrütung abgelesen.

1. Versuch:
mit Mucidan 1:10.

0,2 ccm Mucidan werden zu 1,8 ccm Bouillon zugesetzt, dazu 1 Öse Diphtheriebacillen zugegeben. Weitere Ausführung wie oben angeführt.

Nach 10', 20', 30', 45', 60' waren je 5 Stämme vom Gravis-, Mitis- und Intermediustyp abgestorben.

2. Versuch:
mit Mucidan 1:200.

Zu 2 ccm einer mit Bouillon auf 1:200 verdünnten Mucidanlösung wird 1 Öse Diphtheriebacillen zugesetzt, weitere Ausführung wie oben beschrieben.

	nach:	10'	20'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	−
	3. Stamm:	+	+	+	−
	4. Stamm:	+	+	+	+
	5. Stamm:	+	+	+	−
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	+
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+

Vom Gravis- und Intermediustyp waren nach 60' noch alle gewachsen, während beim Mitistyp 3 Stämme bereits abgetötet waren.

3. Versuch:
mit Mucidan 1:100.

Versuchsanordnung wie bei Versuch 2, nur Mucidan 1:100 statt 1:200.

	nach:	10'	20'	30'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	—
Mitis:	1. Stamm:	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	—	—
	5. Stamm:	+	+	—	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—
	4. Stamm:	+	+	+	—

Nach 30' waren alle Mitisstämme und 1 Intermediusstamm abgetötet, aber kein Gravisstamm. Nach 60' waren 4 Gravis-, alle Mitis- und Intermediusstämme abgetötet.

4. Versuch:

Wiederholung mit Mucidan 1:100.

Versuchsdurchführung wie beim vorhergehenden Versuch.

	nach;	20'	30'	40'	50'	60'
Gravis:	1. Stamm:	+	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+	—
	5. Stamm:	+	+	+	+	+
Mitis:	1. Stamm:	+	+	+	—	—
	2. Stamm:	+	+	+	—	—
	3. Stamm:	+	+	+	—	—
	4. Stamm:	+	+	—	—	—
	5. Stamm:	+	+	+	—	—
Intermedius:	1. Stamm:	+	+	+	+	—
	2. Stamm:	+	+	+	+	+
	3. Stamm:	+	+	+	+	+
	4. Stamm:	+	+	+	+	—

Nach 40' war 1 Mitisstamm, aber kein Gravis- und Intermediusstamm abgetötet; nach 50' waren alle Mitisstämme abgestorben, dagegen alle Gravis- und Intermediusstämme noch am Leben; nach 60' waren 2 Gravis-, alle Mitis- und 2 Intermediusstämme abgetötet.

Ergebnis:

Aus den Mucidanversuchen 1:100 geht ganz eindeutig hervor, daß der Gravistyp am resistentesten ist, während der Mitistyp am leichtesten abzutöten ist; der Intermediustyp nimmt eine Mittelstellung ein, neigt aber mehr dem Gravistyp zu.

IX. Wirkung von Pyocyanase auf die 3 Typen:

Ausführung:

Die im Handel erhältliche Pyocyanaselösung wurde in reiner bezw. in mit Bouillon verdünnter Lösung mit 1 Öse Diphtheriebacillen versetzt, die Einwirkungszeit wurde variiert; danach 0,1 ccm dieser Lösung auf 10 ccm Bouillon überimpft, 48 Std. bebrütet, auf Blutagarplatten ausgestrichen, und nach 48 Std. Bebrütung abgelesen.

1. Versuch:
mit Pyocyanase 1:10.

Nach ½, 2, 3, 4, 6 Stunden waren je 5 Stämme der 3 Typen noch am Leben.

2. Versuch:

Der 1. Versuch wurde wiederholt und ergab nach 1, 2, 3, 6 Stunden das gleiche Resultat, nach 24 Stunden lebten noch alle Gravisstämme, während je 1 Mitis- und Intermediusstamm abgetötet war.

3. Versuch:
mit Pyocyanase purissimum 1:1.

Pyocyanase puriss. wurde mit dem gleichen Volumen Bouillon angesetzt, in 2 ccm davon 1 Öse Diphtheriebacillen gebracht. Weitere Durchführung wie oben beschrieben. Nach

1', 5', 15', 30', 60' waren je 5 der 3 Typenstämme noch am Leben.

4. Versuch:
mit Pyocyanase puriss. 2:1.

2 ccm Pyocyanase puriss. wurden mit 1 ccm Bouillon gemischt, 1 Öse Diphtheriebacillen zugegeben, der Versuch weiter, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach 15', 30', 1, 2, 4, 6, 8 Stunden lebten von je 2 angesetzten Gravis-, Mitis- und Intermediusstämmen noch alle, nach 24 Stunden waren 1 Mitisstamm und beide Intermediusstämme getötet.

Ergebnis:

Die Versuche mit Pyocyanase geben keinen Aufschluß, ob ein Unterschied der Resistenz bei den 3 Typen gegenüber diesem Reagens zu beobachten ist.

Zusammenfassung:

Daß der Diphtheriebacillus durch Desinfektionsmittel im Reagensglas abgetötet werden kann, war bereits bekannt und wurde durch die Versuche dieser Arbeit bestätigt. Bezüglich seiner Resistenz unterscheidet er sich nicht wesentlich von anderen vegetativen Bakterienformen.

Nicht untersucht war bisher, ob sich die 3 Typen der Diphtheriebacillen bei Einwirkung desselben Desinfektionsmittels gleich verhalten oder ob sie eine unterschiedliche Resistenz besitzen. Die vorliegende Arbeit sollte ein Versuch sein, diese Frage zu klären. Hierfür war es nötig, verschiedene Voraussetzungen zu erfüllen:

1. Es mußten stets alle 3 Typen mit dem gleichen Desinfektionsmittel gleichzeitig geprüft werden.
2. Es mußte eine größere Anzahl von Desinfektionsmitteln geprüft werden.
3. Von demselben Typus mußte eine größere Anzahl von Stämmen im selben Versuch angesetzt werden.
4. Es mußte versucht werden, die Konzentration jedes Desinfektionsmittels zu finden, bei der alle 3 Typen getötet wurden, ferner die, bei der noch alle 3 Typen lebten. Zwischen beiden Konzentrationen mußte die Grenzkonzentration ausgetestet werden, bei der evtl. vorhandene Unterschiede der Resistenz beobachtet werden konnten.

Durch die zahlreichen Versuche konnte festgestellt werden, daß sich die 3 Typen der Diphtheriebacillen gegenüber Temperatureinflüssen und Desinfektionsmitteln verschieden verhalten. Der für die Gesamtbeurteilung der Versuchsergebnisse maßgebliche Gesamteindruck ist der, daß die Widerstandsfähigkeit des Typus gravis am größten, die des Typus mitis am geringsten ist; der Typus intermedius nimmt eine Mittelstellung ein, nähert sich aber mehr dem Typus gravis. Dies zeigten vor allem die Versuche:

1. bei Temperaturen von 56° und 48° C.
2. mit n/10-Salzsäurezusatz bei einer Endkonzentration von n/110-Salzsäure.
3. mit 0,5%iger Carbolsäure.
4. mit 2%igem Wasserstoffsuperoxyd.
5. mit Mucidan, das mit Bouillon 1 : 100 verdünnt war.

Die Versuche mit Trypaflavin, Targesin, Pyocyanase und n/10-Natronlauge deuteten zwar Unterschiede im Verhalten gegenüber Umwelteinflüssen an, lassen aber keinen eindeutigen Schluß in dieser Hinsicht zu.

Es wurde ferner beobachtet, daß auch verschiedene Stämme desselben Typus geringe Schwankungen in ihrer Resistenz aufweisen, womit von Anfang an zu rechnen war. Durch die Untersuchung mehrerer Stämme desselben Typus wurde versucht, diese Schwankungen auszugleichen, ebenso dadurch, daß mehrere Desinfektionsmittel auf ihre Wirksamkeit hin geprüft wurden.

Es ist durch diese Versuche auf eine weitere unterschiedliche biologische Eigenschaft der 3 Typen hingewiesen worden, was zur Stützung der 3-Typenlehre der Diphtheriebacillen beitragen kann. Es darf aber auf keinen Fall aus diesen im Reagensglas erhaltenen Resultaten ein voreiliger und noch unbewiesener Schluß auf die Anwendungsmöglichkeit der einzelnen Reagenzien in vivo gezogen werden. Es ist bekannt, daß gerade der Diphtheriebacillus ganz allgemein in vivo sich außerordentlich schlecht beeinflussen läßt, auch durch Präparate, die in vitro eine vorzügliche Wirkung zeigen. Ebenso ist es noch unbewiesen, ob darüber hinaus die 3 Typen sich bei Anwendung eines dieser Stoffe als Desinfiziens am lebenden Objekt genau so unterschiedlich verhalten wie im Reagensglas.

Herrn Prof. Dr. med. Selter danke ich, daß ich die Arbeit in seinem Institut durchführen durfte. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. med. habil. Weiland für die freundliche Ueberlassung des Themas und die mir jederzeit gewährten liebenswürdigs Ratschläge.

Literaturnachweis.

1. Anderson, Happold, Mc Leod, Thomson J. of Path. 34, 667, 1931.
2. Bertarelli, Zbl. f. Bakter. 1. Abtlg. Orig. 66, 538, 1912.
3. Brieger u. Fränkel, Roux und Yersin Ref. Gins, Handb. der pathogen. Mikroorg. 5. Bd., I, 481, 1928.
4. Carter, H. S., J. of Hyg. 33, 542, 1933, Ref. Z. f. Hyg. 31, 422, 1934
5. Christison u. May, J. of Path. 37, 243, 1933; Zbl. Bakter. I. Orig. 133, 59, 1934.
6. Clauberg, Klin. Wschr. 1933, Nr. 25, 939; Kl. Wschr. 1936, I, 231.
7. Cobbett L., Lancet 1901, II, 610.
8. Mc. Daniel, J. of Boston Soc. med. Sci. 4, 75, 1900.
9. Dittharn, Zbl. f. Bakter. 1. Abtlg. Orig. 80, 375, 1918.
10. Durand, Soc. Biol. 81, 1011, 1918; 83, 611, 613, 1920; 84, 982, 1921.
11. Eagleton u. Baxter, Brit. med. J. 1, 139, 1922; J. of Hyg. 22, 107, 1923.
12. Emmerich u. Loew, Zbl. f. Bakter. 1. Abtlg. Orig. 69, 95, 1913.
13. Erzin, Zbl. Bakter. I, 137, 97, 1936.
14. Favia, N., Ref. Z. f. ges. Hyg. 34, 406, 1935.
15. Gins, Handb. d. pathog. Mikroorg. 3. Aufl. 5, 451, 1928.
16. Gotschlich, Handb. d. pathog. Mikroorg. 3. Aufl. 1, 33, 1929.
17. Grubb, Thomas, Ref. von Gundel, Z. f. ges. Hyg. 34, 269, 1935.
18. Gundel u. Liebetruth, Z. Hyg. 117, 66, 1935.
19. Gundel u. Tietz, Z. Hyg. 116, 439, 1934.
20. Gundel u. Erzin, Dtsch. med. Wschr. 1936, Nr. 22, 1292.
21. Gundel, Niyazi, Erzin, Zbl. Bakter. 136, 24, 1936.
22. Gundel, Zbl. Bakter. I. Orig. 101, 337, 1927.
23. Hammerschmidt, Zbl. Bakter. I. Orig. 93, 443, 1924; Dtsch. med. Wschr. Nr. 52, 1831, 1924.
24. Hettche, Klin. Wschr. Nr. 3, 88, 1935; Z. Hyg. 117, 33, 1935.
25. Hilgers u. Thoenes, Jahrb. d. Kinderheilkunde, Bd. 147, 1936.
26. v. Hofmann, Zbl. Bakter. I. Orig. 2, 543, 1887.
27. Kliewe, Zbl. Bakter. I. Orig. 101, 6, 44, 199, 1927.
28. Leete, Lancet 1933, II, 1141.
29. Martin, Ann. Inst. Pasteur, 6, 335, 1892; 12, 26, 1898.
30. Murray J. F., Ref. Z. f. ges. Hyg. 35, 192, 1936.
31. Parish, Brit. J. exper. Path. 8, 162, 1927.
32. Park, Williams, Mann, J. of Immunol. 7, 243, 1922.
33. Pesch, Klin. Wschr. 1936, II, 1202.
34. Preuner, Zbl. Bakter. I. Orig. 136, 463; I. Orig. 137, 105, 1936.
35. Reinhardt, Zbl. f. Hyg. 95, 1, 1922.
36. Robinson, J. of Path. 38, 73, 1934; J. of Path. 39, 551, 1934; Ref. Z. f. Hyg. 31, 568, 1934.
37. Schaeffer, Berlin, Klin. Wschr. 1916, Nr. 37, 1041.
38. Schiff u. Werber, Dtsch. med. Wschr. 1935, I. 259.
39. Schloßberger, Zbl. f. ges. Bakter. I. Abtlg. 135, 6, 1935.
40. Seiffert, Zbl. f. Bakter. 1. Abtlg. Orig. 74, 664, 1914.
41. Wesbrook, Trans. Assoc. amer. Physicians 15, 198, 1900.
42. Williams u. Mann, J. med. Res. 8, 83, 1902.
43. Wilson, J. Boston Soc. med. Sci. 4, 75, 1900.
44. Wright, Helen A., May H., Christison, Rankin, Pearson, Cuthbert, Ref. Z. f. ges. Hyg. 35, 658, 1936.
45. Zupnik, Berlin, Klin. Wschr. Nr. 50, 1085, 1897.

LEBENSLAUF.

Ich, Arthur Leinbrock, wurde am 24. Mai 1908 in Prag als Sohn des Architekten Hermann Leinbrock und seiner Ehefrau Eugenie, geb. Waschitza, geboren. Von 1915 bis 1919 besuchte ich in Wien, von da an bis 1920 die Volksschule in Pirna-Copitz bei Dresden, dann das Realgymnasium in Pirna welches ich Ostern 1929 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Ich studierte in Dresden an der Technischen Hochschule Chemie, legte 1932 die Diplom-Ingenieur-Prüfung für Chemiker ab; von 1932 an studierte ich in Bonn Medizin, bestand iu Bonn die ärztliche Vorprüfung am 30. Oktober 1934 und am 22. Juui 1937 in Bonn das Medizinische Staatsexamen.